

Niet-Lineaire Vibratie Spectroscopiën van Biomoleculaire Systemen.

Cees Otto, Teus Tukker, Artemy Voroshilov,
Hans Kanger en Jan Greve

Vakgroep Technische Optica, Biofysische Techniek,
Technische Natuurkunde en Biomedisch Technologisch Instituut
Universiteit Twente, Postbus 217, 7500 AE Enschede.
e-mail: c.otto@tn.utwente.nl

Introductie

Er is recent veel vooruitgang geboekt in de ontwikkeling van niet-lineaire vibratie spectroscopische methoden voor onderzoek van biologische macromoleculaire systemen^(1,2,3,4). De niet lineaire vibratie spectroscopische technieken die in onze groep in gebruik en in ontwikkeling zijn, zijn CARS (coherente anti-Stokes Raman verstrooiing), stRg (gestimuleerde Raman verstrooiing), IR/V-SFG (infrarood-zichtbaar licht som frequentie generatie). Daarnaast wordt gebruik gemaakt van niet-lineaire optische eigenschappen van materie, zoals parametrische fluorescentie, verschil frequentie generatie en tweede harmonische generatie, om laser emissie met geschikte karakteristieken te genereren. Als standaard techniek zijn in de groep zeer geavanceerde Raman microspectrometers voor spontane Raman verstrooiing (spR) beschikbaar.

Het doel van het onderzoek is om gevoelige methoden te ontwikkelen voor detectie van kleine aantallen molekulen, bijvoorbeeld aan oppervlakken en in biologische cellen. We richten ons op de vibratie selectieve technieken omdat: 1) vibraties niet alleen geschikt zijn voor detectie maar ook voor identificatie, 2) vibraties zijn gevoelig voor inter- en intramoleculaire interacties, 3) vibraties kunnen helpen bij het bepalen van de moleculaire orientatie of de relatieve orientatie van molekulen en 4) vibraties maken het mogelijk om zeer snelle dynamica in materie te bestuderen. In het bijzonder niet-lineaire optische technieken zijn interessant vanwege: a) spectrale scheiding tussen fluorescentie en signaal (bijvoorbeeld in CARS en IR/V-SFG), b) gecollimeerde signaal bundel maakt efficiënte signaal collectie mogelijk, c) hoge signaal niveaus door gebruik te maken van gestimuleerde verstrooiings processen (CARS, stRg) en/of door resonantie (IR/V-SFG), d) efficiënte belichting door gecollimeerde lichtbundels, waardoor combinaties met golfgeleiders mogelijk zijn (CARS, stRg en spR) en oppervlakte gevoeligheid ontstaat door evanescente veld excitatie of intrinsieke eigenschappen van $\chi^{(2)}$ (IR/V-SFG).

Na een korte inleiding worden in het vervolg resultaten gepresenteerd van polarisatie-gevoelige multiplex CARS, golfgeleider Raman verstrooiing en een optisch parametrische oscillator. Deze vormt het hart van een IR/V-SFG spectrometer die in ontwikkeling is.

Theorie

In figuur 1 wordt een representatie gegeven van Coherente anti-Stokes Raman verstrooiing, spontane Raman verstrooiing, gestimuleerde Raman verstrooiing en IR/V-SFG. Deze verstrooiings processen meten verschillende materiaalconstanten van de biomoleculen. Zo wordt met CARS de reële en de imaginaire component van de derde-orde elektrische susceptibiliteit gemeten. Spontane Raman en stR zijn alleen afhankelijk van het imaginaire deel van de $\chi^{(3)}$. IR/V-SFG is afhankelijk van de $\chi^{(2)}$.

Onderstaand wordt in een aantal formules aangegeven wat er wordt gemeten in het CARS experiment. In form. 1 wordt de intensiteit van het veld dat door frequentie menging in de materie tot stand komt evenredig is met het (absolute) kwadraat van het geïnduceerde dipoolmoment. In

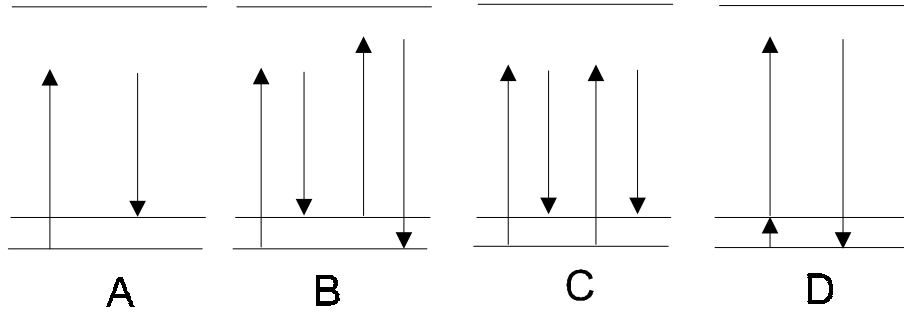


Fig. 1 Energie-niveau schema's van de verstrooiingsprocessen die zich goed laten combineren met onderzoek aan biologische macromolekullen. Alleen de vibratie-resonante schema's zijn weergegeven voor zowel het CARS proces als het IR/V-SFG proces. A) spontane Raman verstrooiing, B) CARS, C) gestimuleerde Raman verstrooiing, D) IR/V-SFG.

form. 1 wordt het veld gemeten met de analysator in de stand e_A . In het geval van CARS is het

$$I_{\text{CARS}}(\omega_{\text{CARS}}) \propto \left| \langle \mathbf{e}_A^* \cdot \mathbf{p}_\mu^{(3)}(\omega_{\text{CARS}}) \rangle \right|^2 \quad (1)$$

geïnduceerde dipoolmoment evenredig met de derde-orde elektrische susceptibiliteit $\chi^{(3)}$ en verder evenredig met alle amplitudes van de velden die betrokken zijn bij het verstrooiings-proces, form. 2. De materiaal-constante $\chi^{(3)}$ is het resultaat van een orientatie middeling over de moleculaire derde-orde elektrische susceptibiliteit.

$$\mathbf{p}_\mu^{(3)}(\omega_{\text{CARS}}) \propto \chi_{\mu\alpha\beta\delta}^{(3)}(\omega_{\text{CARS}}; \omega_0, \omega_1, -\omega_2) : E_0(\omega_0) \mathbf{e}_\alpha \cdot E_1(\omega_1) \mathbf{e}_\beta \cdot E_2^*(\omega_2) \mathbf{e}_\delta^* \quad (2)$$

Een groot aantal termen dragen bij tot de $\chi^{(3)}$. Als de velden geschreven worden in complexe notatie en uitgegaan wordt van een vier niveau systeem zijn er zelfs 13824 ($6^3 \times 4^3$) termen. De $\chi^{(3)}$ is te schrijven als een sommatie over vibraties in de grondtoestand (sommatie over “t” in form. 3) en een sommatie over alle vibronische (aangeslagen) toestanden (sommatie over “k” en “j” in form. 3). De teller is het produkt van alle betrokken overgangsdipoolmoment amplitudes, terwijl de noemer het produkt van een drietal dispersieve functies beschrijft; een resonantie voor het CARS proces, een resonantie voor de pomp-bundel en een (vibratie-)resonantie in de verschil frequentie van

$$\chi_{\mu\alpha\beta\delta}^{(3)R} \approx \sum_t \sum_{k,j} \frac{R_{gk}^\alpha R_{kt}^\mu R_{tj}^\beta R_{jg}^\delta}{(\Omega_k - \omega_{\text{CARS}} - i\Gamma_k)(\Omega_j - \omega_0 + i\Gamma_j)(\Omega_t - (\omega_0 - \omega_2) + i\Gamma_t)} \quad (3)$$

$(\omega_0 - \omega_2)$. Verder inzicht in de $\chi^{(3)}$ wordt verkregen door ons te realiseren dat ze de compositie is van alle mogelijke permutaties van velden, en dus niet alleen van de vibratie-resonante bijdrage die in fig. 1 gepresenteerd is. We kunnen de $\chi^{(3)}$ schrijven als een som van het vibratie-resonante deel (en

$$I_{\text{CARS}}(\omega_{\text{CARS}}) \propto \left| p^{NR} \chi^{(3)NR} + \sum_t p_t^R \frac{A_t^R \exp(i\Theta_t^R)}{(\Omega_t - (\omega_1 - \omega_2) + i\Gamma_t/2)} \right|^2 \quad (4)$$

labellen de verschillende vibraties met “t”) en de niet-vibratie-resonante bijdragen. We verkrijgen dan een handzame uitdrukking (form. 4) voor de CARS intensiteit, die tevens geschikt is om als fit functie te gebruiken voor kwantificering van gemeten CARS-spectra. In deze uitdrukking vinden we verder termen “ p^{NR} ” en “ p_t^R ”, die de bundel-configuratie (polarisatie en orientatie) beschrijven (form.

$$p_t^R = \mathbf{e}_A^* \cdot \left[\rho_{1122}^R \mathbf{e}_0 (\mathbf{e}_1 \mathbf{e}_2) + \rho_{1212}^R \mathbf{e}_1 (\mathbf{e}_0 \mathbf{e}_2) + \rho_{1221}^R \mathbf{e}_2 (\mathbf{e}_0 \mathbf{e}_1) \right] \quad (5)$$

5) van het verstrooiings-experiment en de depolarisatie ratio's van de verschillende materie-bijdragen tot de verstrooiing. De exponentiele functie in form. 4 beschrijft de coherente fase informatie die samenhangt met de electron-kern wisselwerking⁽⁵⁾. Deze spectroscopische parameter kan alleen verkregen worden in coherente verstrooiings-experimenten.

De CARS spectrometer

In fig. 2 is schematisch de picoseconde CARS spectrometer afgebeeld. De opstelling bestaat uit een Nd-YLF laser met 20 Watt intracavity vermogen bij 1053 nm. in 50 ps. pulsen met een herhalingsfrequentie van 76 MHz. Deze golflengte wordt frequentie verdubbeld met behulp van LBO. Dit resulteert in 5 Watt verticaal gepolariseerd licht bij 527 nm. met een pulslengte van 35 ps. Deze bundel wordt gebruikt om twee kleurstof lasers, uitgerust met drie-plaats dubbelbrekende filters, synchroon te pompen. De kleurstof lasers bevatten DCM (~ 100 mW, afstembaar tussen 600-665 nm., pulsbreedte: ~8 ps.) en R6G (~130 mW, afstembaar tussen 565-615 nm., pulsbreedte: ~7 ps.). De kleurstof lasers worden cavity gedumpt tot een herhalingsfrequentie van 3.8 MHz. om de effectiviteit van het CARS proces te verbeteren. De spectrale bandbreedte is ~ 4 cm⁻¹, dichtbij de waarde verwacht voor Fourier transform limiteerde pulsen. De pulsbreedtes worden gemeten met een autocorrelator.

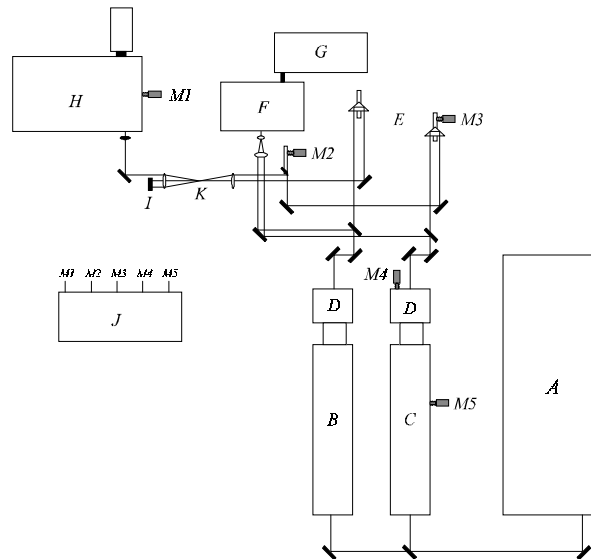


Fig. 2 De (golfgeleider) CARS spectrometer. A) Nd-YLF laser, B) DCM kleurstof-laser, C) R6G kleurstof-laser, D) Cavity dumpers, E) Optische componenten, F) autocorrelator, G) Oscilloscoop, H) Monochromator, I) Nauw-bandig filter voor strooilicht onderdrukking, J) stappen motor besturing, K) golfgeleider positie.

Polarisatie-gevoelige multiplex CARS

Het is belangrijk voor toepassingen in de biofysica dat CARS de mogelijkheid biedt om molekulen verdund in oplossing te bestuderen. In de praktijk betekent dit dat form. 4 niet alleen termen bevat voor het molecuul van interesse maar ook van het oplosmiddel. Dit leidt tot een grote bijdrage van de niet resonante $\chi^{(3)}$ van het oplosmiddel in de totale intensiteit. PCARS (polarisation sensitive CARS) is de experimentele methode om toch tot goed interpreteerbare resultaten te komen. Het idee is dat de depolarisatie ratio van de niet-resonante bijdrage in het algemeen anders zal zijn dan die van de vibratie-resonante bijdrage. Een analisator voor de detector wordt gebruikt om de niet-resonante bjdrage tot de verstrooiing te verkleinen. In figuur 3 wordt de situatie weergegeven voor “ontaardde” CARS, dat wil zeggen een CARS experiment waarbij de frequentie van $\omega_0 = \omega_1$. De

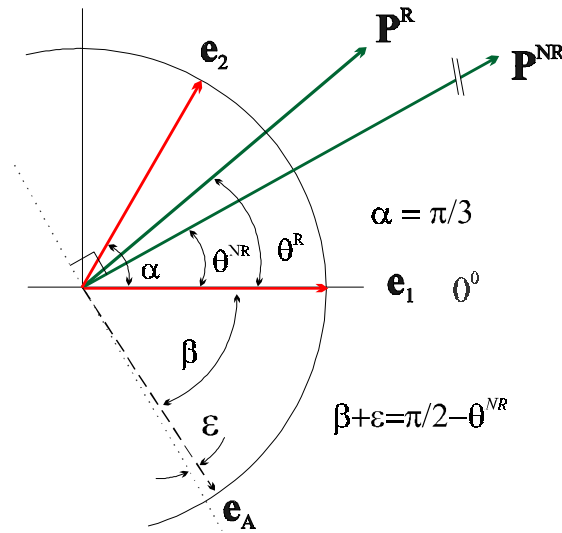


Fig. 3 De orientatie van de polarisatie vectoren in een frequentie ontaard CARS verstrooiings-proces. De hoeken zijn gedefinieerd t.o.v. de richting e_1 . Volledige achtergrond onderdrukking wordt verkregen bij $\epsilon=0^\circ$.

polarisatie-richtingen van ω_0 en ω_2 maken een hoek van 60° met elkaar. De niet-resonante signaal bijdrage heeft dan een polarisatie van 30° . Door de analisator hier loodrecht op te zetten kan volledige achtergrond onderdrukking verkregen worden. Het CARS spectrum wordt dan getypeerd door lijnvormen die een Lorentz-karakter hebben. Omdat de signaal bijdragen niet optelbaar zijn, maar een interferentie met elkaar hebben, leidt de verzwakking van de ene bijdrage ten opzichte van de ander tot sterke veranderingen in de gemeten spectra^(1,4,6,7). Door de spectra te meten bij verschillende analisator standen ontstaat een set van spectra die simultaan gefit kan worden aan een uitdrukking zoals form. 4. In figuur 4 zijn een aantal polarisatie CARS spectra gepresenteerd voor

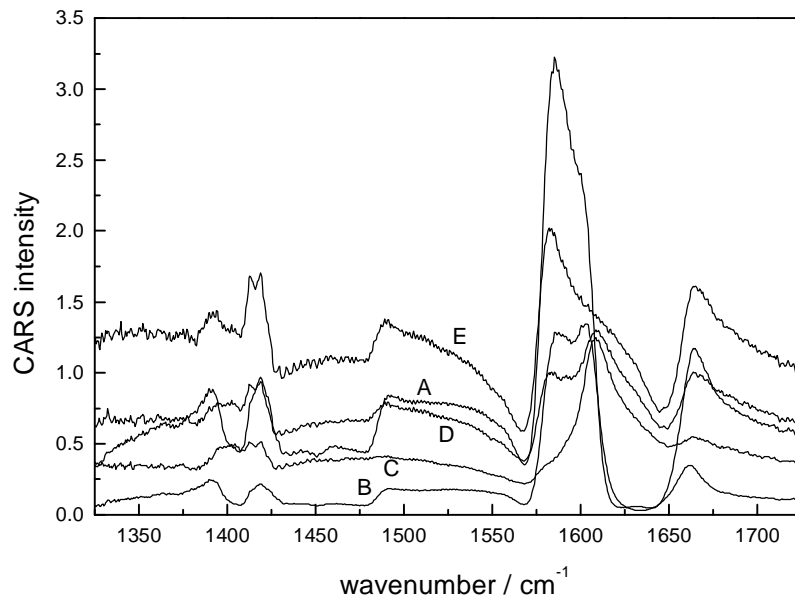


Fig. 4 Polarisatie CARS spectra van Nickel-OctaEthylPorphyrine (Ni-OEP). A) χ_{1221} , $e_A=90^\circ$; B) $e_A=75^\circ$; C) $(\chi_{1221} + 3\chi_{1111})$, $e_A=30^\circ$; D) $e_A=15^\circ$; E) χ_{1111} , $e_A=0^\circ$.

verschillende analisator standen. Een nadeel is dat van de gewenste signaal bijdrage ook alleen de component in de richting van de analisator gemeten wordt. Voor vibraties met een depolarisatie ratio

die belangrijk anders is dan die van de niet-resonante achtergrond is dit geen groot probleem. In het algemeen echter bestaat de behoefte om de spectra bij een zelfde signaal/ruis verhouding in een kortere tijd te registreren. Dit is gerealiseerd door het lyot-filter uit de Stokes dye-laser te halen. Een

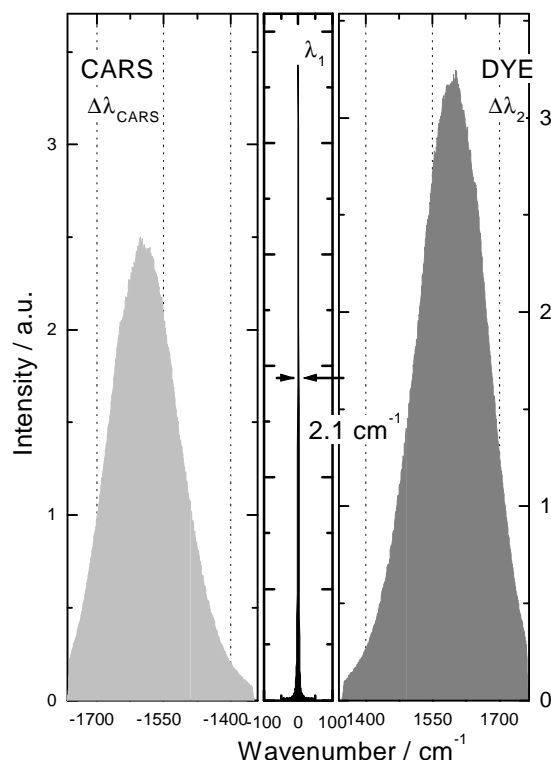


Fig. 5 Multiplex CARS maakt gebruik van een breedbandige dye-laser. De breedbandige anti-Stokes emissie kan efficiënt geregistreerd worden op een multi-kanaals detector.

breedbandige emissie ontstaat ($\sim 400 \text{ cm}^{-1}$) die meerdere vibraties overlapt. De anti-Stokes emissie afkomstig van het sample is diensgevolge ook breedbandig en kan in zijn geheel geregistreerd worden op een multi-kanaals detector. Dit laat zich tevens goed combineren met polarisatie gevoelige metingen⁽⁸⁾.

Golfgeleider Raman technieken

Door golfgeleider structuur te gebruiken als licht-transport medium kunnen de molekulen aangebracht op een golfgeleider met behulp van evanescente veld excitatie zichtbaar gemaakt worden door de Raman verstrooiing van de molekulen te meten. CARS (Coherente anti-Stokes Raman verstrooiing), spontane Raman verstrooiing en gestimuleerde Raman verstrooiing worden gecombineerd met golfgeleiders^(9,10,11,12). De opstelling voor golfgeleider CARS en - stRg is als in figuur 2. Picoseconde laser systemen zijn te preferen boven nanoseconde gepulste laser systemen. De piek powers van de laatste zijn te groot voor inkoppeling in $\sim 1 \mu\text{m}$ dunne golfgeleiders. De vermogensdistributie van een quasi-continu gemodelocked laser systeem maakt het mogelijk ongeveer 50 maal hogere continu vermogens te gebruiken. Door het lagere piekvermogen treedt geen schade aan golfgeleiders op terwijl de signaal-ruis verhouding verbetert. Dit is ook een gevolg van een goed gedefinieerde mode structuur en lage fluctuaties in de intensiteit van puls tot puls.

In figuur 6 is voor verschillende golfgeleider verstrooiings-experimenten de signaal/ruis verhouding uitgezet als functie van de respons⁽¹³⁾. De respons κ is het produkt van de laagdikte en de Raman verstrooiingsdoorsnede ten opzichte van dit produkt voor een monolaag benzeen molekulen.

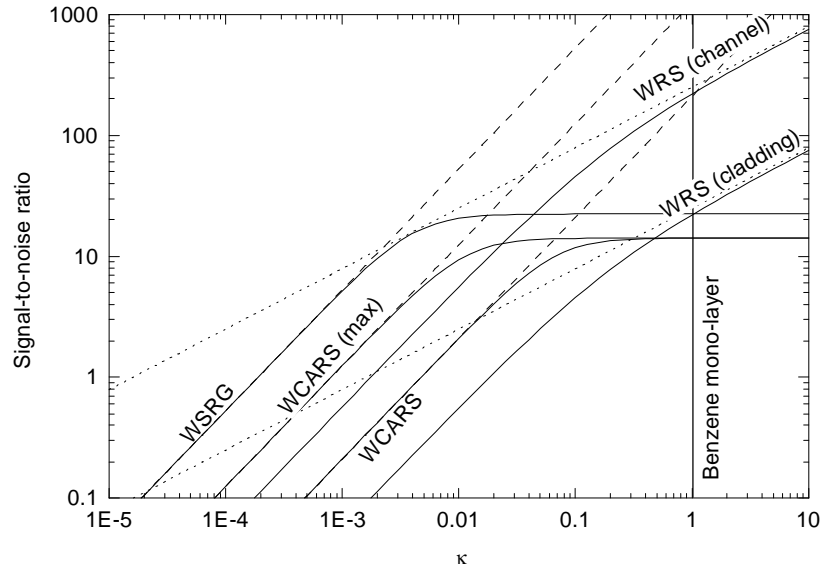


Fig. 6 Een vergelijking van de theoretische signaal-ruisverhouding in een golfgeleider CARS, golfgeleider stRg en golfgeleider spR.. Het produkt van de Raman verstrooiingsdoorsnede \times monolaag dikte van benzeen is gelijk gesteld aan 1.

De intensiteit van het verstrooide licht in spontane Raman verstrooiing en CARS is respectievelijk lineair en kwadratisch afhankelijk van het aantal molekulen. Om collectie zo efficiënt mogelijk te maken zijn de volgende golfgeleider aspecten van belang: 1) Een efficiënte koppeling van het laserlicht in de golfgeleider, 2) Een lage damping in de golfgeleider, 3) grote evanescente veldamplitudes aan het oppervlak, 4) voor achtergrond onderdrukking (van het golfgeleider materiaal) in CARS experimenten is het gewenst dat de niet-resonante achtergrond wordt onderdrukt^(x). Daarom moet naast de 0de-orde mode ook een 1ste-orde mode kunnen propageren, 5) een lage Raman verstrooiingsdoorsnede van het materiaal van de golfgeleider.

Prisma-inkoppeling en “end-face” inkoppeling zijn gebruikt om licht in de golfgeleider in te koppelen. Prisma koppelaars zijn makkelijk te fabriceren en gaan lang mee, echter meer belangrijk is dat er bij in-/uit-koppeling geen golflengte afhankelijkheid is. In fig. 7 is de externe koppelingshoek uitgezet als functie van de brekingsindex van het prisma materiaal, voor een aantal effectieve brekingsindices van de golfgeleider.

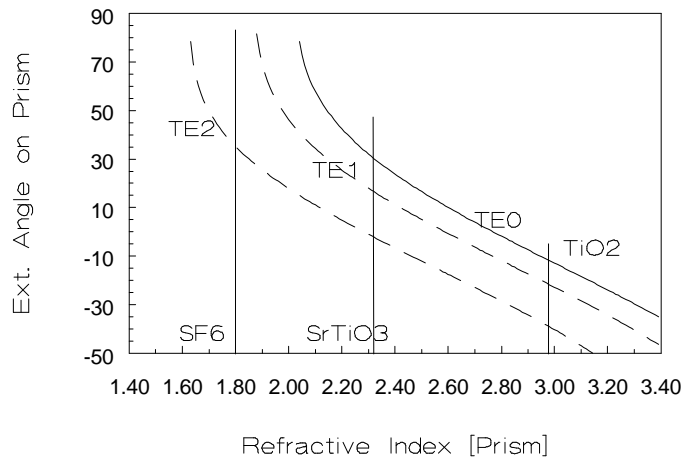


Fig. 7 De externe hoek als functie van de brekingsindex van het prisma voor een aantal n_{eff} . Voor de optimale hoeken moet een prisma materiaal gekozen worden met een

geschikte brekingsindex. Met een SF6 ($n=1.8$) prisma kunnen alleen hoge orde modes ingekoppeld worden in ZnO. Met Rutiel ($n=2.98$) kunnen lage orde modes ingekoppeld worden, terwijl hoge orde modes alleen bij ongunstige hoeken (hoge reflectieverliezen) ingekoppeld kunnen worden.

De eigenschappen van golfgeleiders hangen af van de materialen en methoden die gebruikt worden om de golfgeleiders te maken. Voor de lineaire optische eigenschappen zijn de brekingsindex en de dispersie van belang. De onderdrukking van de achtergrond in CARS hangt af van de reële en imaginaire deel van de $\chi^{(3)}$ van het materiaal. Verschillende materialen zijn gebruikt, zoals siliciumoxynitride (SiO_xN_y), siliciumnitride (Si_3N_4) en zinkoxyde (ZnO). De golfgeleiders worden opgebouwd op silicium waarop een siliciumoxyde laag is gegroeid met "natte" oxydatie. SiO_xN_y -lagen worden gegroeid met behulp van low pressure chemical vapour deposition (LPCVD) of pressure enhanced chemical vapour deposition (PECVD). SiO_xN_y heeft als voordeel dat golfgeleiders met een brekingsindex tussen 1.46-2.0 gegroeid kunnen worden. De zuiverheid en compositie van de golfgeleiders hangt af van de techniek. Met behulp van PECVD worden brede en intense Raman banden gemeten die toegekend kunnen worden aan N-H- en O-H-strek vibraties. Dit maakt SiO_xN_y gegroeid met PECVD minder geschikt voor spontane Raman verstrooiing. Si_3N_4 wordt gegroeid met LPCVD-technieken. De brekingsindex van Si_3N_4 is $n=2.00$.

Raman spectra zijn gemaakt van een lipide monolaag (component van biologische membranen), cytochroom C (electron transporterend eiwit), albumine (globulair eiwit uit de bloedbaan) en bacteriorhodopsine (lichtgevoelig eiwit uit de retina). In figuur 8 wordt een spectrum getoond van bacteriorhodopsine.

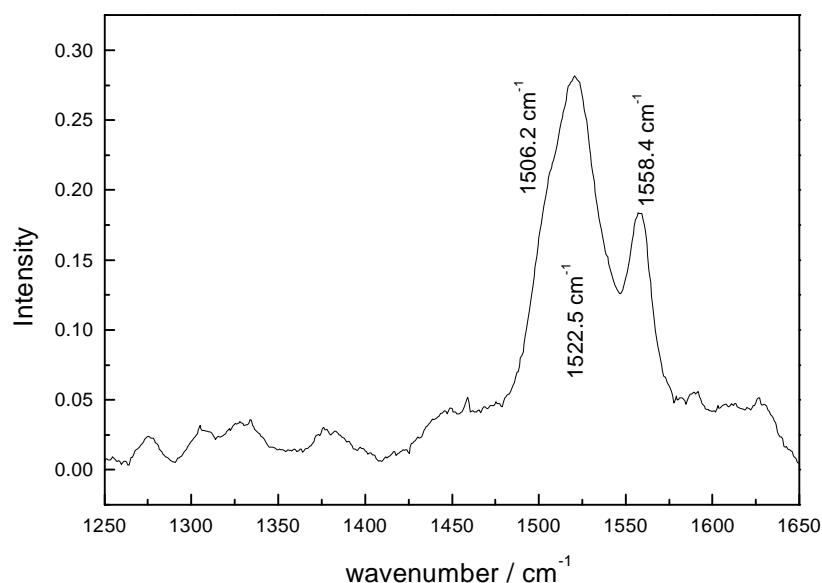


Fig. 8 Golfgeleider Raman spectrum van een monolaag van bacteriorhodopsine. Dit eiwit speelt een essentiële rol in de detectie van licht in het oog. De posities van enkele Raman "marker" bands voor de toestand van retinal zijn aangegeven.

Infrarood-Visible Som Frequentie vibratie spectrometer

Een spectrometer voor infrarood-zichtbaar licht som frequentie generatie is in ontwikkeling (fig. 9). In de literatuur is aangetoond dat de vibraties van molekulen in monolagen op diverse oppervlakken gemeten kunnen worden. In verband met de toepassing op bio-organische materialen

wordt een spectrometer gebouwd op basis van een afstembare infrarood laser, die gepulst licht met een hoge repetitie frequentie geeft. Om afstembaar mid-infrarood licht te kunnen genereren is

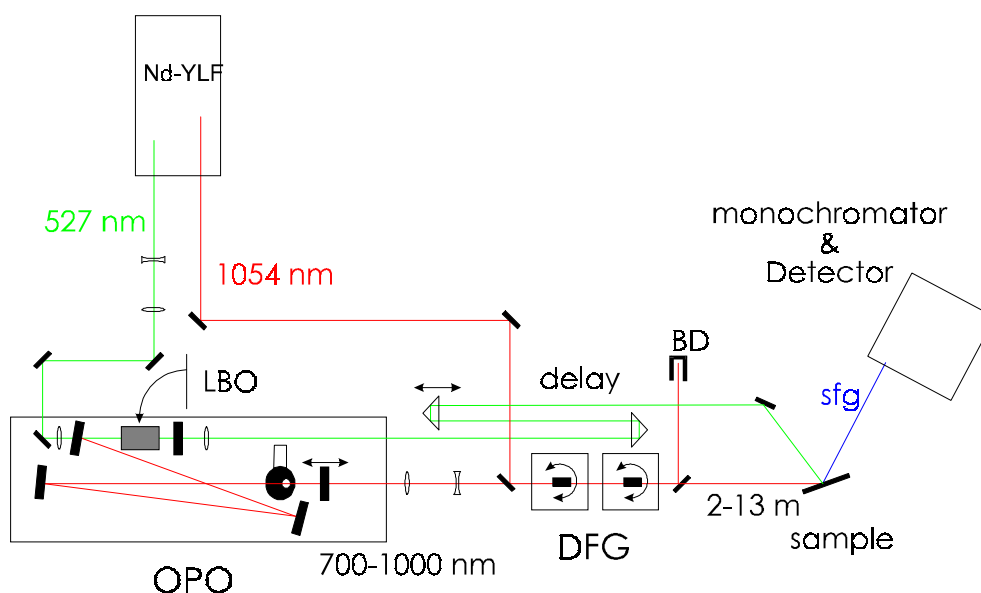


Fig. 9 Schema van de Infrarood-zichtbaar licht Som Frequentie vibratie spectrometer. De spectrometer bestaat uit een modelocked Nd-YLF laser, optisch parametrische oscillator, verschil frequentie generator, preparaat opstelling en detectie eenheid. Het geheel wordt onder labview vanuit een computer bestuurd.

begonnen met de bouw van een afstembare nabij infrarood optische parametrische oscillator op basis van LBO⁽¹⁴⁾. De emissie van deze oscillator wordt vervolgens gemengd met de fundamentele bundel uit de Nd-YLF laser in een verschil frequentie proces. Met behulp van LiNbO₃ wordt afstembaar infrarode emissie gegenereerd tussen 2.5 en 4.5 μm .

In samenwerking met dr. E. Eliel (Univ. Leiden en dr. L. van der Meer (FOM, FELIX, Nieuwegein) zijn infrarood/visible som frequentie experimenten uitgevoerd met de vrije electronlaser FELIX. Het is nog niet gelukt om monolagen van eiwitten geadsorbeerd aan oppervlakken aan te tonen. Wel is het gelukt om een goed IR/V-SFG spectrum te meten tussen 7 en 8 μm van een dunne laag van calixareen. De bulk van calixareen is ongeoriënteerd en levert geen bijdrage tot de $\chi^{(2)}$. Door de calixareen molekulen te oriënteren met behulp van corona-poling wordt het materiaal $\chi^{(2)}$ -actief. De lokalisatie van het $\chi^{(2)}$ -actieve materiaal is bepaald door een oppervlakte scan uit te voeren. Polarisation karakteristieken van het signaal zijn gemeten voor 8 verschillende polarisation combinaties.

Conclusies

Polarisation Multiplex CARS is een krachtige techniek voor het onderzoek van de structuur en interacties in biologische macromolekulen. De techniek is zeer gevoelig en levert goede resultaten bij de bestudering van reactie-centra in biologische macromolekulen. Tevens is de relatie bestudeerd tussen de electron-kern koppeling in porphyrines en de coherente fase zoals die in CARS gemeten wordt. Een verband tussen de symmetrie van vibraties en de coherente fase is aanwezig in kopertetraphenylporphyrine (CuTPP). Sommige vibratie in de porphyrine in hemoglobine voldoen ook aan het aangetoonde verband.

Monolagen van biologische macromolekulen aangebracht op golfgeleiders kunnen met spontane Raman bestudeerd worden. Golfgeleider CARS is gevoelig genoeg om lagen van met een dikte van ~ 80 nm. te detecteren. Daarnaast kunnen zowel Spontane Raman spectroscopie als CARS toegepast worden voor onderzoek van de golfgeleiders zelf. Voor beide technieken is het mogelijk om van de polarisation eigenschappen van de verstrooiingstensenoren gebruik te maken de orientatie van molekulen aan het oppervlak te bepalen. Golfgeleider Raman technieken bieden een algemeen

toepasbare methode om de $\chi_{NR}^{(3)}$ van golfgeleiders te bepalen. Dit is gedaan voor SiO_xN_y en ZnO . Daarnaast is aangetoond dat gestimuleerde Raman verstrooiing in golfgeleiders veelbelovend is voor de detectie van monolagen.

Voor de ontwikkeling van een “table-top” IR/V-SFG spectrometer is een synchroon gepompte optisch parametrische oscillator gebouwd. De repetitie frequentie is 76 Mhz. De emissie is afstembaar tussen 750 en 900 nm. De bandbreedte is $\Delta\nu/\nu=2.5\times 10^{-4}$. Binnen het afstemmingsgebied wordt ongeveer 650 mW “signal” gegenereerd. In de tweede versie is de drempel voor oscillatie gereduceerd zodat nu een conversie-efficiëntie van ongeveer 35% (alleen “signal”) wordt bereikt. Door verschil frequentie generatie vande OPO-emissie met de 1053 nm. in infrarood passieve kristallen (LiNbO_3 , AgGaS_2 , etc.) wordt continu afstembaar infrarood licht gegenereerd. Deze ontwikkeling moet leiden tot de eerste volledig synchroon gepompte IR/V-SFG spectrometer, speciaal voor monolagen van biologische macromolekullen. IR/V-SFG kan in reflectie op vaste stof - en vloeistof oppervlakken toegepast worden.

Verantwoording

Dit onderzoek wordt uitgevoerd in de vakgroep Technische Optica van de Universiteit Twente. De fabricage van golfgeleiders wordt uitgevoerd in het MESA instituut aan de Universiteit Twente. Dit onderzoek wordt gesteund door de Stichting voor Fundamenteel Onderzoek van de Materie (FOM) en de Stichting Technische Wetenschappen (STW).

Referenties

- 1) A. Yu. Chikishev, G.W. Lucassen, N.I. Koroteev, C. Otto, J. Greve, Biophys. J. 63, p. 976 (1992).
- 2) J.S. Kanger, C. Otto, J. Greve, Appl. spectroscopy, 49, p. 1326, (1995).
- 3) P.A. Terpstra, C. Otto, G.M.J. Segers-Nolten, J.S. Kanger, J. Greve, Biospectroscopy, 1, p. 255 (1995).
- 4) A. Voroshilov, G.W. Lucassen, C. Otto, J. Greve, J. of Raman spectr. 26, p. 443 (1995).
- 5) A. Voroshilov, C. Otto and J. Greve, “On the Coherent Vibrational Phase in Polarisation Sensitive Resonance CARS Spectroscopy of Copper TetraPhenylPorphyrin”, acc. J. Chem. Phys. (1997).
- 6) A.Yu. Chikishev, N.I. Koroteev, C. Otto, and J. Greve, Acc. J. Raman Spectr. 27, p.? (1996).
- 7) A. Voroshilov, C. Otto and J. Greve, Appl. Spectr. 50, p. 78 (1996).
- 8) A. Voroshilov, PhD-thesis “Polarised Coherent Raman and Saturation Micro-Raman Studies of Biological Macromolecules”, Januari, (1997).
- 9) J.S. Kanger, T.W. Tukker, C. Otto and J. Greve, Optics Letters 21, p. 671 (1996).
- 10) J.S. Kanger, C. Otto and J. Greve, Optics Letters 20, p. 2231 (1996).
- 11) J.S. Kanger, C. Otto and J. Greve, J. Phys. Chem. 100, p. 16293 (1996).
- 12) J.S. Kanger, C. Otto, M. Slotboom and J. Greve, J. Phys. Chem. 100, p. 3288 (1996).
- 13) J.S. Kanger, PhD-thesis “Waveguide Spontaneous and Coherent Raman Spectroscopy on (Bio)Molecules at Surfaces”, September, (1996).
- 14) T.W. Tukker and C. Otto, “A Temperature-tuned, Narrow Bandwidth Lithium Triborate Optical Parametric Oscillator Synchronously Pumped with 35 picosecond pulses from a Mode-Locked Nd-YLF Laser”, subm. (1997).